

4

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-091839

(43)Date of publication of application : 06.04.2001

(51)Int.Cl. G02B 21/00
G01B 11/30

(21)Application number : 11-265328

(71)Applicant : OLYMPUS OPTICAL CO LTD

(22)Date of filing : 20.09.1999

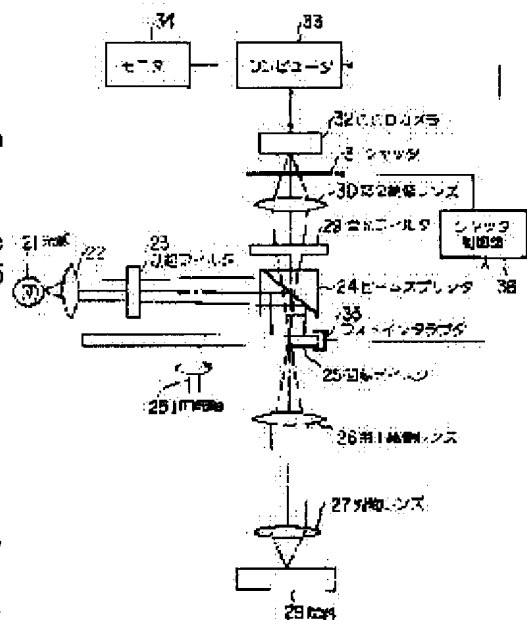
(72)Inventor : ENDO TOMIO

(54) CONFOCAL MICROSCOPE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a confocal microscope that a confocal image having optimum brightness can be obtained by a simple constitution.

SOLUTION: On a condition that a rotary disk 25 having a random pinhole pattern part 25a and an aperture part 25b is rotated at a fixed speed, a photointerrupter 35 detects a marker 25e for judging whether an image is the image passed through the pattern part 25a of the disk 25 or the image passed through the aperture part 25b as for a light beam from a light source 21. Synchronously with the detection output of the photointerrupter 35, a shutter 31 is opened and closed so as to pick up the composite image passed through the pattern part 25a or the bright visual field image passed through the aperture part 25b extending over a prescribed time by using a CCD camera 32. Then, the confocal image is obtained by calculating the difference of stored image data between the picked-up composite image and the picked-up bright visual field image.



1055090

4

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-91839

(P2001-91839A)

(43) 公開日 平成13年4月6日 (2001.4.6)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームコード* (参考)
G 0 2 B 21/00		G 0 2 B 21/00	2 F 0 6 5
G 0 1 B 11/30		G 0 1 B 11/30	Z 2 H 0 5 2

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願平11-265328

(22) 出願日 平成11年9月20日 (1999.9.20)

(71) 出願人 000000376

オリンパス光学工業株式会社

東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号

(72) 発明者 遠藤 富男

東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 オリ

ンパス光学工業株式会社内

(74) 代理人 100058479

弁理士 鈴江 武彦 (外4名)

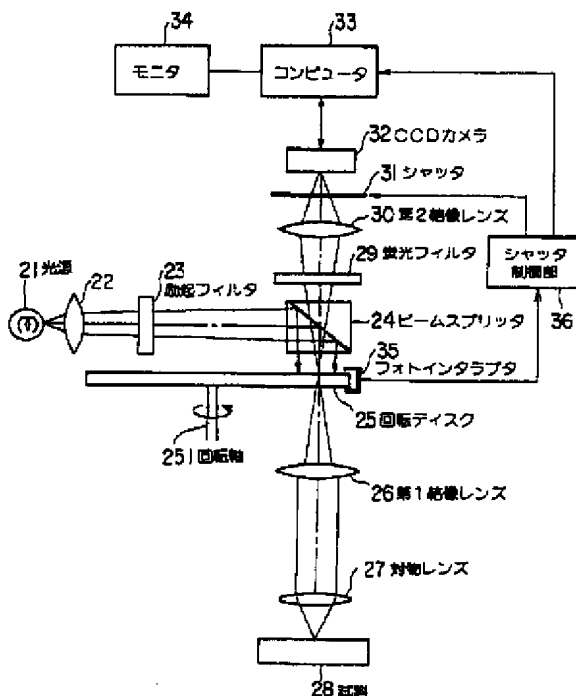
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 共焦点顕微鏡

(57) 【要約】

【課題】 本発明は、簡単な構成で、最適な明るさの共焦点画像を得ることができる共焦点顕微鏡を提供する。

【解決手段】 光源 21 から光をランダムピンホールパターン部 25 a と開口部 25 b を有する回転ディスク 25 を一定速度で回転させた状態で、回転ディスク 25 のランダムピンホールパターン部 25 a を通過した像が開口部 25 b を通過した像かを判断するマーカ 25 e を検出するフォトインタラプタ 35 の検出出力に同期してシャッタ 31 を開閉動作させランダムピンホールパターン部 25 a を通過した複合画像または開口部 25 b を通過した明視野画像を CCD カメラ 32 で所定時間に亘って撮像し、この撮像により得られた複合画像と明視野画像の蓄積画像データの差分演算から共焦点画像を得る。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】 光源からの光を試料に導く光学系と、光の通過部分と光の遮蔽部分が混在した半通過領域と光が通過する開口部を有し、その回転により前記光路上に前記半通過領域または開口部を位置させる回転部材と、この回転部材の前記光路上に位置される前記回転部材の半通過領域または開口部を判別する判別手段と、この判別手段での判別結果に従って前記半通過領域を通過された複合画像または前記開口部を通過された明視野画像のそれぞれの積分画像データを取得する積分画像取得手段と、

この積分画像取得手段で取得した各画像データから前記試料の共焦点画像を生成する共焦点画像生成手段とを具備したことを特徴とする共焦点顕微鏡。

【請求項 2】 前記積分画像取得手段は、前記判別手段による前記回転部材の半通過領域または開口部の判別結果に同期させて開閉されるシャッタを有することを特徴とする請求項 1 記載の共焦点顕微鏡。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、光を利用して試料の微小構造や 3 次元の形状を高速に観察・測定する共焦点顕微鏡に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 従来、共焦点顕微鏡として、多数のピンホールをそのピンホール径の 10 倍程度の間隔で螺旋状に配置した Nipkow ディスクと呼ばれるディスクを用いたものが知られている。

【0003】 ところが、Nipkow ディスクを用いた共焦点顕微鏡は、隣接するピンホールからのクロストークを除く必要があるため、隣接するピンホールの間隔を大きくせざるを得ないことから、光源からの光の利用率が 1% 程度低く、暗い画像しか得られないという問題があった。

【0004】 そこで、このような Nipkow ディスクを用いた共焦点顕微鏡の改良を図ったものとして、R. Juskaitis, T. Wilson らの "Efficient real-time confocal microscopy with white light sourcer", Nature 誌 Vol. 383 Oct. 1996 p804-806 および WO97/31282 に開示されたものがある。

【0005】 図 7 は、T. Wilson らによる共焦点顕微鏡の概略構成を示すもので、ハロゲン光源または水銀光源などの光源 1 からの光の光路上に光学レンズ 2 およびビームスプリッタ 3 を配置し、試料 6 まで光源 1 からの光を導くためのビームスプリッタ 3 の反射光路上に回転ディスク 4、対物レンズ 5 を配置し、また、ビームスプリッタ 3 の透過光路上に結像レンズ 8 を介して CCD カメラ 9 を配置し、この CCD カメラ 9 にモニター 11

を有するコンピュータ 10 を接続している。

【0006】 ここで、回転ディスク 4 は、回転軸 7 を介して図示しないモータの軸に連結され一定の回転速度で回転するもので、図 8 に示すように、多数のピンホールの配置がランダムで、ピンホール総面積が 25~50% になるようなランダムピンホールパターン部 4a と光が自由に透過できる開口部 4b と、これらランダムピンホールパターン部 4a と開口部 4b との間にあって光を遮断する遮光部 4c、4d を有している。

【0007】 このような構成において、光源 1 から出射された光が光学レンズ 2 を介してビームスプリッタ 3 に入射され、ビームスプリッタ 3 で反射された光は、一定の回転速度で回転する回転ディスク 4 に入射され、この回転ディスク 4 のランダムピンホールパターン部 4a と開口部 4b を交互に通過し、対物レンズ 5 を介して試料 6 に照射される。また、試料 6 からの反射光は、対物レンズ 5 を介し、再度回転ディスク 4 のランダムピンホールパターン部 4a と開口部 4b を通過し、さらにビームスプリッタ 3 を透過し、結像レンズ 8 を介して CCD カメラ 9 で撮像される。この場合、CCD カメラ 9 は、回転ディスク 4 の回転速度に同期して撮像タイミングが制御されていて、ランダムピンホールパターン部 4a と開口部 4b を通過した 2 つの画像を別々に撮像する。

【0008】 そして、CCD カメラ 9 の出力画像データは、コンピュータ 10 に送られ、蓄積されるとともに、画像処理される。この場合、ランダムピンホールパターン部 4a を介して得られる画像データは、ピンホールの密度が通常の Nipkow ディスクの数十倍であるため、共焦点画像に非共焦点画像が加わった複合画像データとして得られ、また、開口部 4b を介して得られる画像データは、非共焦点画像である明視野画像データとして得られるので、これら画像データを差分演算することによって共焦点画像データを求め、この共焦点画像をモニター 11 に表示するようにしている。

【0009】 なお、試料 6 表面近傍の立体画像を得る場合は、試料 6 を垂直移動ステージやピエゾ素子によって図示上下方向 (イ) に移動させ、高さ方向で撮像位置を変えた共焦点画像を取得し、撮像位置を変えた複数の共焦点画像をコンピュータ 10 により合成することにより立体画像をモニター 11 に表示する。

【0010】 従って、このような T. Wilson らの共焦点顕微鏡によれば、Nipkow ディスクを用いたものでは、光源からの入射光に対して利用できる試料からの光が 0.5~1% 程度しかなかったものが、25~50% も利用できるようになり、数十倍明るい画像を得ることができるので、従来、応用できないとされていた生物観察への適用の可能性がある。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】 しかしながら、生物の蛍光観察を行なうような場合、試料から発せられる蛍光

は非常に微弱な光であるため、一般には、撮像部分に冷却したCCDなどを用い、通常のTVレートより露出時間を長くして撮像を行なうようにしている。

【0012】しかし、このようにCCDの露出時間を長くして撮像を行なうとなると、上述したT. Wilsonらの共焦点顕微鏡では、モータの回転に同期して回転ディスク4を1回転させる間にランダムピンホールパターン部4aを介して得られる複合画像データと開口部4bを介して得られる明視野画像データを1枚ずつ取得できる構成になっているので、CCDの露出時間を長くするだけでは、これら2つの画像データが混合されてしまい共焦点画像データのみを取り出すことが難しくなる。

【0013】そこで、CCDの露出時間が長くなる分だけモータの回転速度を遅くすればよいが、CCDの露出時間は、観察する試料の蛍光の明るさによって変化されるため、モータの回転速度を任意に変えられるようにすることが必要である。しかし、通常使用されるDCモータやACモータの回転数を広い範囲で安定に変えられるには、複雑な制御回路が必要になったり、精度の高い減速ギアが必要になるなど、装置が大掛かりとなり価格的に高価になるという問題点がある。また、モータとしてパルスモータを使用することも考えられるが、パルスモータの場合振動や発熱が生じ、これらが観察系に悪影響を及ぼすなどの問題点があった。

【0014】本発明は上記事情に鑑みてなされたもので、簡単な構成で、最適な明るさの共焦点画像を得ることができる共焦点顕微鏡を提供することを目的とする。

【0015】

【課題を解決するための手段】請求項1記載の発明は、光源からの光を試料に導く光学系と、光の通過部分と光の遮蔽部分が混在した半通過領域と光が通過する開口部を有し、その回転により前記光路上に前記半通過領域または開口部を位置させる回転部材と、この回転部材の前記光路上に位置される前記回転部材の半通過領域または開口部を判別する判別手段と、この判別手段での判別結果に従って前記半通過領域を通過された複合画像または前記開口部を通過された明視野画像のそれぞれの積分画像データを取得する積分画像取得手段と、この積分画像取得手段で取得した積分画像データから前記試料の共焦点画像を生成する共焦点画像生成手段とを具備したことを特徴としている。

【0016】請求項2記載の発明は、積分画像取得手段が、前記判別手段による前記回転部材の半通過領域または開口部の判別結果に同期させて開閉されるシャッタを有することを特徴としている。

【0017】この結果、請求項1記載の発明によれば、回転部材が複数回転される間、半通過領域を通過された複合画像または開口部を通過された明視野画像を積分するようにしたので、蛍光観察のように撮像時間が長く設定されたような場合も、回転部材の回転速度を変化する

ことなく、最適な明るさになるまで複合画像または明視野画像を蓄積することで、これら積分画像から最適な明るさの共焦点画像を得ることができる。

【0018】また、請求項2記載の発明によれば、複合画像または明視野画像の蓄積画像は、シャッタの開閉動作により得られるので、装置としても簡単で、価格的にも安価にできる。

【0019】

【発明の実施の形態】以下、本発明の一実施の形態を図面に従い説明する。

【0020】図1は、本発明が適用される共焦点顕微鏡の概略構成を示している。図において、21は光源で、この光源21は、ハロゲン光源または水銀光源からなっている。そして、光源21からの光の光路上に光学レンズ22、励起フィルタ23およびビームスプリッタ24を配置している。

【0021】この場合、励起フィルタ23は、後述する試料28での蛍光を励起する波長を選択するためのものである。

【0022】ビームスプリッタ24から試料28までの反射光路上には回転ディスク25、第1の結像レンズ26、対物レンズ27が配置され、また、ビームスプリッタ24の透過光路上に蛍光フィルタ29、第2の結像レンズ30、シャッタ31を介してCCDカメラ32が配置される。そして、このCCDカメラ32にモニタ34を有するコンピュータ33を接続している。

【0023】この場合、回転ディスク25は、回転軸251を介して図示しないモータの軸に連結され一定の回転速度で回転するものであり、図2に示すように、多数のピンホールの配置がランダムで、ピンホール総面積が25～50%になるような半通過領域からなるランダムピンホールパターン部25aと光が自由に通過できる開口部25bと、これらランダムピンホールパターン部25aと開口部25bとの間にあって光を遮断する遮光部25c、25dを有し、さらに回転ディスク25周縁に沿って、ランダムピンホールパターン部25aを通過した複合画像か、開口部25bを通過した明視野画像かを判断するためのマーカ25eを有している。また、このような回転ディスク25周縁に対応させてフォトインタラプタ35を配置している。フォトインタラプタ35は、マーカ25eの状態から、CCDカメラ32に投影されている像がランダムピンホールパターン部25aを通過した複合画像か、開口部25bを通過した明視野画像かを判別できるようにしている。

【0024】蛍光フィルタ29は、試料28からの蛍光の波長のみを通し、光源21からの光を遮断するものである。

【0025】シャッタ31は、シャッタ制御部36の指示により開閉制御されるもので、シャッタ制御部36は、フォトインタラプタ35の検出出力に同期してラン

ダムピンホールパターン部25aを通過した複合画像または開口部25bを通過した明視野画像のみを通過させるようにシャッタ31の開閉を制御するようになっている。

【0026】CCDカメラ32は、コンピュータ33からの指示により撮像の開始、終了、撮像画像の転送などが制御され、ここでの撮像時間は、試料28の蛍光の明るさによって異なるが、数秒程度に設定されている。

【0027】コンピュータ33は、シャッタ制御部36によるシャッタ31の開閉制御に対応させてCCDカメラ32で撮像された画像データを取込み演算処理してモニタ34に表示させるようにしている。

【0028】次に、このように構成した実施の形態の動作を説明する。

【0029】いま、光源21から出射された光が光学レンズ22、励起フィルタ23を介してビームスプリッタ24に入射されると、ビームスプリッタ24で反射された光は、一定の回転速度で回転する回転ディスク25のランダムピンホールパターン部25aと開口部25bとに交互に照射される。この照射された光は、第1の結像レンズ26、対物レンズ27を介して試料28に照射される。

【0030】次いで、試料28からの蛍光は、対物レンズ27、第1の結像レンズ26を介し、回転ディスク25のランダムピンホールパターン部25aと開口部25bを通過し、さらにビームスプリッタ24を透過し、蛍光フィルタ29により試料28からの蛍光成分のみを通過し、第2の結像レンズ30を介してCCDカメラ32に結像する。

【0031】この状態から、まず、図3に示すタイミングチャートにしたがって、CCDカメラ32により複合画像を撮像する。

【0032】この場合、コンピュータ33の指示により、同図(a)に示す「H」レベル信号をCCDカメラ32に与え、所定の期間、撮像状態を維持させる。この撮像時間は、試料28の蛍光の明るさによって異なるが数秒程度に設定される。

【0033】この状態で、回転ディスク25の回転に応じて、回転ディスク25のマーカ25eの状態を検出するフォトインタラプタ35により、同図(b)に示すようにランダムピンホールパターン部25aに対応する「H」レベル信号と、開口部25bに対応する「L」レベル信号が交互に発生する。

【0034】このフォトインタラプタ35の検出出力は、シャッタ制御部36に入力される。シャッタ制御部36は、同図(c)に示すように、フォトインタラプタ35により入力されるランダムピンホールパターン部25aに対応する「H」レベル信号に同期して、シャッタ31に対し「H」レベル信号を開放指示信号として出力し、この間だけシャッタ31を開状態に移行させる。こ

れにより、シャッタ31は、ランダムピンホールパターン部25aが光路上に位置した時にのみ開放するように制御されることとなり、試料28からの蛍光は、ランダムピンホールパターン部25aを通過し、共焦点画像に非共焦点画像が加わった複合画像としてCCDカメラ32に撮像される。このCCDカメラ32により撮像される複合画像データは、所定時間が経過して、コンピュータ33からの指示が同図(a)に示す「L」レベル信号に移行するまで積分され、その後、この積分画像データは、コンピュータ33に送られる。

【0035】次に、図4に示すタイミングチャートにしたがって、CCDカメラ32により明視野画像を撮像する。

【0036】この場合、コンピュータ33の指示により、同図(a)に示す「H」レベル信号をCCDカメラ32に与え、所定の期間、撮像状態を維持させる。この撮像時間も、試料28の蛍光の明るさによって異なるが数秒程度に設定される。

【0037】この状態で、回転ディスク25の回転に応じて、回転ディスク25のマーカ25eの状態を検出するフォトインタラプタ35より、同図(b)に示すようにランダムピンホールパターン部25aに対応する「H」レベル信号と、開口部25bに対応する「L」レベル信号が交互に発生する。

【0038】このフォトインタラプタ35の検出出力は、シャッタ制御部36に入力される。シャッタ制御部36は、同図(c)に示すように、フォトインタラプタ35より入力される開口部25bに対応する「L」レベル信号に同期して、シャッタ31に対し「H」レベル信号を開放指示信号として出力し、この間だけシャッタ31を開状態に移行させる。これにより、シャッタ31は、開口部25bが光路上に位置した時にのみ開放するように制御されることとなり、試料28からの蛍光は、開口部25bを通過し、非共焦点画像である明視野画像としてCCDカメラ32に撮像される。このCCDカメラ32により撮像される明視野画像データは、所定時間が経過して、コンピュータ33からの指示が同図(a)に示す「L」レベル信号に移行するまで積分され、その後、この積分画像データは、コンピュータ33に送られる。

【0039】その後、コンピュータ33により、複合画像データと明視野画像データの差分演算が実行されて共焦点画像データが生成され、この生成された共焦点画像データがモニタ34に表示される。

【0040】なお、この実施の形態では、蛍光観察の場合を述べたが、励起フィルタ23と蛍光フィルタ29を取り除けば、通常の反射型顕微鏡による試料観察に適用できる。また、試料28から得られる光量が十分ある場合は、回転ディスク25の回転数を、例えば1800rpmにしておけば、CCDカメラ32に代えて通常のN

TSC仕様のカメラを用いることができる。

【0041】したがって、このような構成とすれば、回転ディスク 25 を一定速度で回転させた状態で、シャッタ 31 の開閉動作に同期させてランダムピンホールパターン部 25 a を通過した複合画像または開口部 25 b を通過した明視野画像を CCD カメラ 32 で所定時間に亘って撮像し、この撮像により得られた複合画像と明視野画像の蓄積画像データの差分演算から共焦点画像データを得るようにしたので、非常に暗い試料 28 である蛍光観察のように CCD カメラ 32 での撮像時間が長く設定されたような場合も、従来のように回転ディスク 25 の回転速度を変化することなく、最適な明るさになるまで複合画像データまたは明視野画像データを蓄積することで、これら積分画像データから最適な明るさの共焦点画像を得ることができる。

【0042】また、複合画像または明視野画像の蓄積画像データは、シャッタ 31 の開閉動作により得られるので、従来の回転ディスク 25 の回転速度を変化させるため複雑な制御回路や精度の高い減速ギアを用いたものと比べて、装置として簡単にでき、価格的にも安価にできる。

【0043】なお、上述した実施の形態では、シャッタ 31 を CCD カメラ 32 の直前に配置しているが、光源 21 と光学レンズ 22 との間または励起フィルタ 23 とビームスプリッタ 24 との間に配置するようにしてもよい。このようにすると、ランダムピンホールパターン部 25 a を介して複合画像を、開口部 25 b を介して明視野画像を取込んでいる以外は、光源 21 からの光が試料 28 側に照射しないようにできるので、試料 28 の蛍光の褪色を極力防止できる。

【0044】また、上述した実施の形態では、回転ディスク 25 として、多数のピンホールを有するランダムピンホールパターン部 25 a を有するものを述べたが、図 5 に述べたように、ランダムピンホールパターン部 25 a に代えて、多数のラインを形成したラインパターン部 25 f を有するものを用いることができる。この場合、図 5 は、図 2 と同一部分には、同符号を付している。

【0045】さらに、回転ディスク 25 に代えて、図 6 に示すように円筒状をなす回転体を用いることもできる。この場合、円筒状の回転体 41 の周面に沿って多数のピンホールをランダムに形成したランダムピンホールパターン部 41 a と光が自由に通過できる開口部 41 b と、これらランダムピンホールパターン部 41 a と開口部 41 b との間にあって光を遮断する遮光部 41 c、41 d を有し、さらに回転体 41 の一方開口端の周縁に沿って、ランダムピンホールパターン部 41 a を通過した像か、開口部 41 b を通過した像かを判断するためのマーカ 41 e を有するようにしている。このような回転体

41 を用いても上述したと同様な効果を期待できる。

【0046】

【発明の効果】以上述べたように本発明によれば、簡単な構成で、しかも最適な明るさの共焦点画像を得ることができる共焦点顕微鏡を提供できる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】本発明の一実施の形態の概略構成を示す図。

【図 2】一実施の形態に用いられる回転ディスクの概略構成を示す図。

10 【図 3】一実施の形態の動作を説明するためのフローチャート。

【図 4】一実施の形態の動作を説明するためのフローチャート。

【図 5】本発明に用いられる他の回転ディスクの概略構成を示す図。

【図 6】本発明に用いられる他の回転ディスクの概略構成を示す図。

【図 7】従来の共焦点顕微鏡の概略構成を示す図。

20 【図 8】従来の共焦点顕微鏡に用いられる回転ディスクの概略構成を示す図。

【符号の説明】

21…光源

22…光学レンズ

23…励起フィルタ

24…ビームスプリッタ

25…回転ディスク

25 1…回転軸

25 a…ランダムピンホールパターン部

25 b…開口部

30 25 c、25 d…遮光部

25 e…マーカ

25 f…ラインパターン部

26…第 1 の結像レンズ

27…対物レンズ

28…試料

29…蛍光フィルタ

30…第 2 の結像レンズ

31…シャッタ

32…CCD カメラ

40 33…コンピュータ

34…モニタ

35…フォトインタラプタ

36…シャッタ制御部

41…回転体

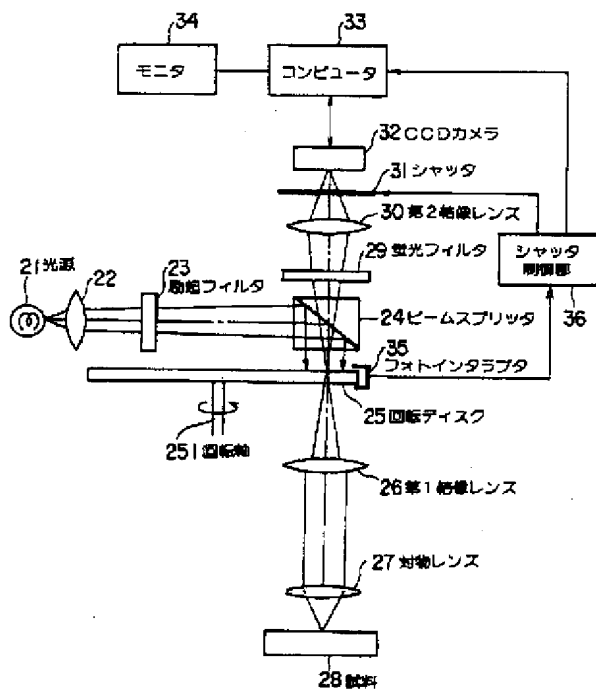
41 a…ランダムピンホールパターン部

41 b…開口部

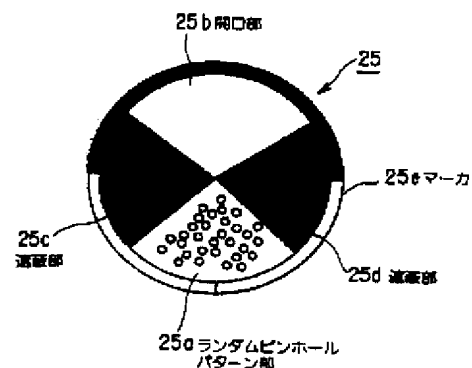
41 c、41 d…遮光部

41 e…マーカ

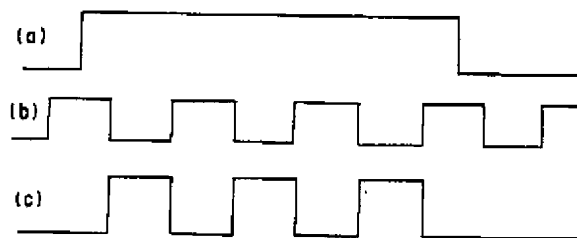
【図1】



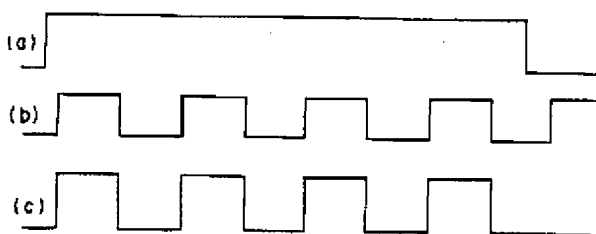
【図2】



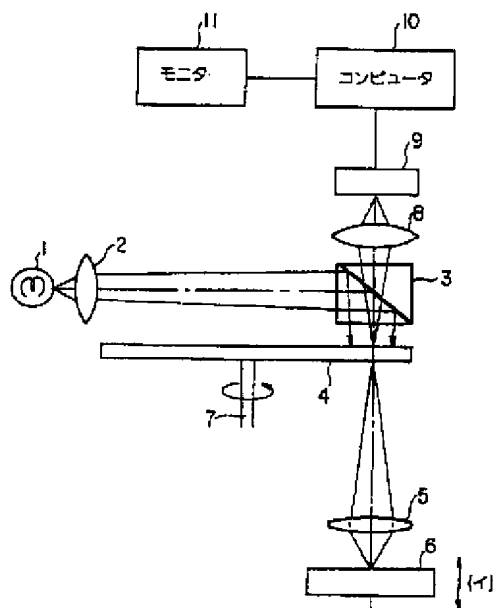
【図4】



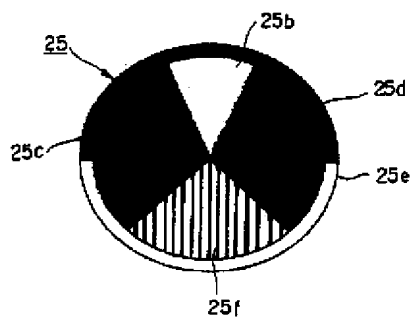
【図3】



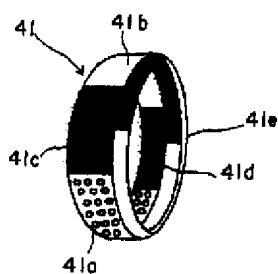
【図7】



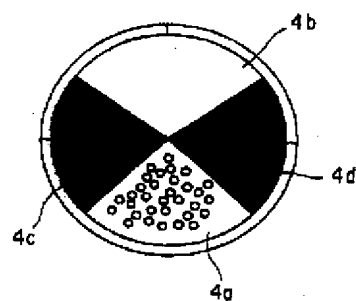
【図5】



【図6】



【図8】



フロントページの続き

Fターム(参考) 2F065 AA51 AA53 DD00 DD06 DD09
 FF42 GG02 GG03 GG12 HH13
 JJ03 JJ09 JJ26 LL04 LL22
 LL26 LL30 LL46 NN11 NN17
 PP24 QQ14 QQ25 SS02 SS13
 2H052 AA08 AA09 AC04 AC07 AC08
 AF21 AF25